

**OPTIMALISASI pH PRODUKSI ENZIM SELULASE DARI
BAKTERI ENDOFITIK *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC45,
Pseudomonas cepacia LBKURCC48 DAN
Pseudomonas stutzeri LBKURCC59**

Ajaib Prima¹, Silvera Devi ², Saryono²

¹Mahasiswa Program Studi S1 Kimia

²Bidang Biokimia Jurusan Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau

Kampus Bina Widya Pekanbaru, 28293, Indonesia

primapoerba08@gmail.com

ABSTRACT

The isolate of LBKURCC45, LBKURCC48 and LBKURCC59 are endophytic bacteria that have been isolated from the tubers of dahlia. Endophytic bacteria can get into the plant tissue through injured plant tissue or because the bacteria can produce cellulase to degrade plant cell wall that contain cellulose. Cellulase is an enzyme that can hydrolyze the β -1-4-glycosidic bond of cellulose. This study was carried out to determine the optimum pH of cellulase enzyme production (6.0; 6.5; 7.0; 7.5; and 8.0). Enzyme activity was calculated based on the amount of reducing sugar formed from *Carboxymethyl cellulose* (CMC) substrate hydrolyzed by cellulase enzyme with Nelson-somogyi method. The result showed that the highest activity of cellulase enzyme obtained at pH 7 at 24 hours production time. The cellulase activity of LBKURCC45, LBKURCC48, and LBKURCC59 was $0.415 \pm 0.043 \times 10^{-3}$ U/mL, $0.353 \pm 0.069 \times 10^{-3}$ U/mL, and $0.246 \pm 0.050 \times 10^{-3}$ U/mL, respectively.

Keywords : *Carboxymethyl cellulose* (CMC), Cellulolytic bacteria, enzyme activity

ABSTRAK

Isolat LBKURCC45, LBKURCC48 dan LBKURCC59 merupakan bakteri endofitik yang diisolasi dari umbi tanaman dahlia. Bakteri endofitik dapat masuk ke dalam jaringan tumbuhan melalui jaringan tanaman yang luka, atau karena bakteri ini mampu menghasilkan enzim selulolitik untuk mendegradasi dinding sel tanaman yang mengandung selulosa. Selulase adalah enzim yang dapat mengkatalisis reaksi pemutusan ikatan β -1-4-glikosidik dalam selulosa. Pada penelitian ini dilakukan penentuan pH optimum produksi enzim selulase (6,0; 6,5; 7,0; 7,5; dan 8,0). Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan dihitung berdasarkan jumlah gula pereduksi yang terbentuk dari proses hidrolisis

substrat *Carboxymethyl cellulose* (CMC) oleh enzim selulase dengan metode Nelson-somogyi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas enzim selulase tertinggi diperoleh pada pH 7 dengan waktu produksi 24 jam. Aktivitas enzim untuk masing-masing isolat LBKURCC45, LBKURCC48 dan LBKURCC59 diperoleh sebesar $0,415 \pm 0,043 \times 10^{-3}$ U/mL, $0,353 \pm 0,069 \times 10^{-3}$ U/mL dan $0,246 \pm 0,050 \times 10^{-3}$ U/mL.

Kata Kunci : *Carboxymethyl cellulose* (CMC), Bakteri selulolitik, aktivitas enzim

PENDAHULUAN

Enzim selulase merupakan suatu enzim yang mampu menguraikan selulosa dengan cara menghidrolisis ikatan β -1,4 glikosidik menjadi bentuk yang lebih sederhana yaitu monomer glukosa (Lehninger, 1998). Selulosa adalah suatu polimer glukosa yang tidak bercabang yang mengandung unit-unit glukosa yang dihubungkan oleh ikatan β -1,4-glikosidik. Enzim selulase memiliki aplikasi luas dan sangat potensial digunakan dalam berbagai industri dan untuk pengolahan limbah selulosa dalam pembuatan kompos atau untuk penguraian limbah pertanian yang mengandung selulosa menjadi produk yang bernilai ekonomis yaitu glukosa.

Bakteri endofitik adalah bakteri yang hidup dalam jaringan internal tanaman dan tidak bersifat patogen terhadap inangnya. Bakteri endofitik tidak hanya memiliki kemampuan memproduksi metabolit sekunder tetapi juga dapat menghasilkan enzim-enzim hidrolitik seperti amilase, selulase, dan ligninase (Choi dkk., 2005). Bakteri endofitik biasanya masuk pertama kali melalui bagian atas tanaman seperti batang, bunga, stomata ataupun kotiledon dan daun yang sobek (Yulianti, 2012), dapat juga masuk karena bakteri

menghasilkan enzim selulase dengan mendegradasi dinding sel tumbuhan yang dominan mengandung selulosa (Kaga dkk., 2009).

Peneliti sebelumnya telah melakukan isolasi dari berbagai umbi dahlia dan diperoleh 19 bakteri endofitik yang belum diketahui kemampuannya untuk menghasilkan enzim selulase (Robi'a, 2012 & Purba, 2012). Peneliti selanjutnya telah melakukan uji aktivitas selulase dari 19 isolat bakteri endofitik dalam media selektif yang mengandung *Carboxymethyl cellulose* (CMC) sebagai sumber karbon dengan menggunakan metode Nelson-somogyi dan ternyata diperoleh 3 isolat yang menghasilkan enzim selulase dari isolat lain yaitu KCP₂ (LBKURCC45) sebesar $1,66 \pm 0,03 \times 10^{-3}$ U/mL, MHP₂ (LBKURCC48) sebesar $0,75 \pm 0,04 \times 10^{-3}$ U/mL dan KP₂ (LBKURCC59) sebesar $7,16 \pm 0,06 \times 10^{-3}$ U/mL (Marlinda, 2013).

Produksi enzim dari suatu mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh faktor internal (faktor genetik) dan faktor eksternal (kondisi fermentasi). Faktor eksternal antara lain faktor suhu, pH, senyawa penginduksi, sumber karbon, waktu produksi dan agitasi, sedangkan faktor internal atau faktor genetik sangat dipengaruhi oleh DNA dari spesies mikroorganisme yang menghasilkan

enzim selulase belum tentu menghasilkan aktivitas selulase yang sama. Berdasarkan hal tersebut, dilakukan optimalisasi pH untuk produksi enzim selulase dari isolat bakteri *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC45, *Pseudomonas cepacia* LBKURCC48 dan *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC59.

METODE PENELITIAN

a. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Autoklaf (*All American Model No. 2X*), Spektrofotometer UV-VIS (*Thermo Scientific Model Genesys 10 S*), Waterbath (*Grant Instrument Type SUB 28*), Vortex (*H-VM-300*), Shaking Incubator (*LabTech Model LSI-3016R* Seri No. B110221102), Oven (*Fisher Scientific Model 655F*), Incubator (*Memmert*), pH meter (*Hanna Instrument H18014*), Tabung eppendorf dan peralatan gelas laboratorium umum lainnya yang digunakan sesuai dengan prosedur kerja.

Isolat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu LBKURCC45, LBKURCC48, dan LBKURCC59 yang merupakan koleksi Laboratorium Riset Enzim, Fermentasi dan Bio molekuler FMIPA UR. Bahan kimia yang digunakan antara lain *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) (*Brataco Chemika J1438/4*), *Nutrient Agar* (*Merck, No. cat. 1.05450.0500*), *Nutrient Broth* (NB) (*Merck, No. cat. 1.05443.0500*), glukosa, larutan buffer fosfat, reagen Nelson-somogyi, reagen Arsenomolibdat, dan bahan-bahan lain yang digunakan adalah

bahan tingkat analisis sesuai dengan metoda kerja.

b. Peremajaan bakteri

Peremajaan isolat bakteri LBKURCC45, LBKURCC48 dan LBKURCC59 dilakukan dengan mengambil satu ose stok isolat secara aseptis dari stok NB, kemudian diinokulasikan kembali pada *Nutrient Agar* (NA) miring yang steril, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

c. Pembuatan inokulum bakteri selulolitik

Bakteri dari hasil peremajaan satu tabung agar miring diambil secara aseptis dengan mengambil satu ose stok isolat dan dimasukkan ke dalam 50 ml media *Nutrient Broth* (NB), kemudian diinkubasi di dalam shaker inkubator dengan kecepatan agitasi 120 rpm pada suhu 37°C selama 12 jam untuk digunakan sebagai inokulum dan selanjutnya dilakukan pengukuran *Optical density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm.

d. Pembuatan media cair untuk produksi enzim selulase

Bahan yang digunakan untuk produksi enzim selulase dari isolat bakteri selulolitik sesuai dengan media Philippidis (1991), yang terdiri dari KH_2PO_4 0,2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,14 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,0001 g; $\text{Co}(\text{NH}_2)_2$ 0,03 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,00092 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,0003 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,00027 g; CMC 1 g. Semua bahan dilarutkan dalam 100 mL buffer fosfat dengan variasi pH 6,0;

6,5; 7,0; 7,5; dan 8,0. Media ini dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan 15 lb, 121⁰C selama 20 menit. Media siap diinokulasi jika tidak ada tanda-tanda kontaminasi setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar.

e. Optimalisasi pH produksi enzim selulase

Inokulum isolat LBKURCC45, LBKURCC48 dan LBKURCC59 sebanyak 10% ditambahkan masing-masing ke dalam media cair produksi enzim 100 ml, kemudian diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan agitasi 120 rpm pada suhu 37⁰C selama 24 jam. dengan variasi pH media (6,0; 6,5; 7,0; 7,5 dan 8,0). Ekstrak kasar enzim selulase yang terdapat dalam media dipisahkan dari sel isolat dengan cara disentrifugasi dingin selama 10 menit dengan kecepatan 9500 rpm. Sebelum sentrifugasi, media kultur yang berisi enzim didinginkan dalam lemari pendingin pada suhu 4⁰C selama kurang lebih 1 jam. Supernatan disaring dan ditambahkan NaN₃ sebanyak 0,02% (^{b/v}) ke dalam setiap larutan supernatan jika tidak langsung dilakukan uji aktivitas enzim.

f. Penentuan aktivitas enzim selulase

Aktivitas ekstrak kasar enzim yang dihasilkan ditentukan dengan metode Nelson-Somogyi. Tabung uji diisi 0,5 mL substrat CMC 2% yang dilarutkan dengan buffer fosfat 0,05 M pH 6,0, sedangkantabung kontrol dibiarkan dalam keadaan kosong, kemudian dimasukkan ke dalam waterbath selama 5

menit pada suhu 40⁰C. Tabung uji dan kontrol ditambahkan 0,5 mL enzim dengan tanpa mengeluarkan tabung-tabung dari waterbath dan diinkubasi selama 30 menit. Tabung blanko diisi larutan buffer fosfat 0,05 M pH 6,0 sebanyak 1 mL. Masing-masing tabung ditambahkan 0,5 mL reagen Nelson-somogyi dan tabung kontrol ditambahkan 0,5 mL substrat CMC 2%, Semua tabung reaksi tersebut dipanaskan dalam penangas air selama 20 menit dan didiamkan hingga suhu kamar. Selanjutnya, reagen arsenomolibdat ditambahkan 0,5 mL, divorteks dan didiamkan selama 5 menit. Tabung-tabung reaksi tersebut ditambahkan 3 mL akua demineralisata, kemudian didiamkan selama 30 menit. Jika terdapat endapan, larutan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 9500 rpm dan absorbansi filtrat diukur. Pengukuran aktivitas enzim masing-masing dilakukan tiga kali pengulangan untuk setiap sampel. Sebagai standar dibuat larutan standar dengan berbagai konsentrasi. Absorbansi masing-masing larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 540 nm. Hal yang sama juga dilakukan pada sampel dengan variasi pH 6,5; 7,0; 7,5 dan 8,0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Penentuan pH optimal untuk produksi enzim selulase

Aktivitas ekstrak kasar enzim yang dihasilkan dari ketiga isolat ini ditentukan berdasarkan jumlah gula pereduksi yang

dihasilkan dari reaksi selulase menggunakan substrat CMC 2% tiap satuan waktu. Kadar gula pereduksi ditentukan dengan metode Nelson-

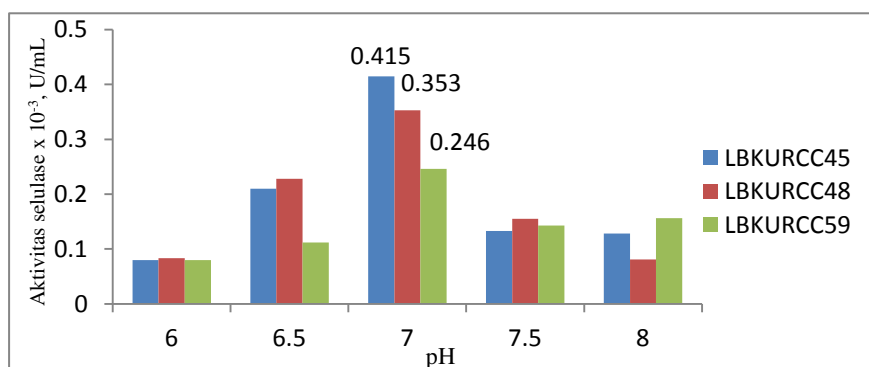
somogyi dan aktivitas selulase dari ketiga isolat pada setiap variasi pH dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1: Aktivitas ekstrak kasar enzim selulase yang dihasilkan dari bakteri LBKURCC45, LBKURCC48 dan LBKURCC59 pada variasi pH media produksi

Variasi pH media	Aktivitas Enzim Selulase x 10 ⁻³ (U/mL) *		
	LBKURCC45	LBKURCC48	LBKURCC59
6,0	0,080 ± 0,032 ^c	0,083 ± 0,033 ^c	0,080 ± 0,028 ^b
6,5	0,210 ± 0,065 ^b	0,228 ± 0,057 ^b	0,112 ± 0,019 ^b
7,0	0,415 ± 0,043 ^a	0,353 ± 0,069 ^a	0,246 ± 0,050 ^a
7,5	0,133 ± 0,078 ^{bc}	0,155 ± 0,028 ^{bc}	0,143 ± 0,081 ^{ab}
8,0	0,128 ± 0,029 ^{bc}	0,081 ± 0,063 ^c	0,156 ± 0,086 ^{ab}

Hasil Anova dan uji Duncan jarak berganda pada taraf 5% menunjukkan bahwa aktivitas selulase tertinggi dari bakteri LBKURCC45, LBKURCC48 dan LBKURCC59 diperoleh pada pH produksi 7. Uji statistik untuk aktivitas enzim selulase LBKURCC45 dan LBKURCC48 menunjukkan berbeda nyata secara signifikan ($p < 0,05$) antara pH 7 dengan pH 6,0; 6,5; 7,5 dan 8,0, sedangkan untuk LBKURCC59 ternyata tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) pada pH 6,0; 6,5; 7,5 dan 8,0. Grafik optimalisasi pH dapat dilihat pada Gambar 1. Secara umum grafik menunjukkan aktivitas enzim selulase meningkat dari pH 6 sampai pH optimum 7, kemudian aktivitas enzim

selulase menurun jika pH semakin tinggi. Penurunan yang terjadi diatas pH optimum diduga selama proses inkubasi telah terjadi perubahan kondisi lingkungan enzim dari pH normal menjadi pH yang basa (Megahati, 2001). Perubahan pH yang tidak sesuai akan menyebabkan daerah katalitik dan konformasi enzim ikut berubah. Hal ini terjadi karena adanya perubahan sifat ionik yang terdapat pada gugus karboksil dan gugus amino dari enzim. Perubahan pH tersebut dapat menyebabkan terganggunya pengikatan enzim dengan substrat, sehingga perubahan pH ini nantinya akan mengakibatkan denaturasi enzim dan menurunnya aktivitas enzim.



Gambar 1. Hubungan pH produksi dengan aktivitas enzim selulase

KESIMPULAN

Hasil optimalisasi pH dari ketiga bakteri selulolitik yaitu LBKURCC45, LBKURCC48 dan LBKURCC59 menunjukkan bahwa pH terbaik diperoleh pada pH 7 dengan masing-masing aktivitas enzim selulase sebesar $0,415 \pm 0,043 \times 10^{-3}$ U/mL; $0,353 \pm 0,069 \times 10^{-3}$ U/mL dan $0,246 \pm 0,05 \times 10^{-3}$ U/mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dra. Silvera devi Sy, MSi dan Bapak Prof. Dr. Saryono, MSi yang telah membimbing dan memotivasi serta membantu penelitian dan penulisan karya ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Choi, Y.W., Hodgkiss, I. J., & Hyde, K. D. 2005. Enzyme Production by Endophytes of *Brucea Javanica*. *Journal Agricultural Technology*. 1:55-65.
- Kaga, H., Mano, H., Tanaka, F., Watanabe, A., Kaneko, S., & Morisako, H. 2009. Rice Seeds as Source of Endophytic Bacteria. *Microbes Environ*. 24(2): 154–162.
- Lehninger, A. L. 1998. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jilid 1. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Marlinda, S. 2013. Uji Aktivitas Spesifik Enzim Selulolitik dari Beberapa Bakteri Endofitik Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). *Skripsi FMIPA UR*. Pekanbaru.
- Megahati, R., R., P. 2001. Deteksi Mutasi Gen Penisilin Penisilin G Asilase Dari *Escherichia coli* B130 Hasil PCR Mutagenik dengan Metode Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP). *Tesis Biologi Institut Teknologi Bandung*. Bandung.
- Philippidis, G. P. 1991. Evaluation of The Current Status of The Cellulase Production Technology. *Biochemical Engineering and Modeling for Cellulase Production*. B01778: 9.
- Purba, T. M., Saryono., & Puspita, F. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofitik dari Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). *Jurnal Ilmiah Sains Terapan*. 3(2): 91-95.
- Robi'a., Saryono., & Puspita, F. 2012. Skrining Bakteri Endofitik dari Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). *Jurnal Ilmiah Sains Terapan*. 3(2): 153-158.
- Saropah, A., Jannah, A., & Maunatin, A. 2012. Kinetika reaksi enzimatik ekstrak kasar enzim bakteri selulolitik hasil isolasi dari bekatul. *Alchemy*. 2(1):34-45.
- Yulianti, T. 2012. Menggali Potensi Endofit untuk Meningkatkan Kesehatan Tanaman Tebu Mendukung Peningkatan Produksi Gula. *Perspektif*. 11(2):111-122.